

Flukonazol'ün *Candida Albicans* Suşlarına Etkinliğinin İn-Vitro Mikrodilüsyon Yöntemi İle Araştırılması

Semra KUŞTİMUR*, Levent KUTLUAY*, Sema YAVUZ*

Özet: Yeni bir triazol türevi antifungal olan flukonazol'ün *in-vivo* ve *in-vitro* duyarlılığı arasında oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Çeşitli kandidozlarda *in-vivo* etkinliği başarılı bulunmasına rağmen, kandidalarla yapılan bazı *in-vitro* çalışmalarda flukonazol'ün yüksek yoğunlukta bile etkili olmadığı gösterilmektedir.

Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemi ile, gentamisinli Sabouraud buyyonu kullanılarak, flukonazol'ün *Candida albicans* suşlarına etkisi incelendi. En düşük engelleyici yoğunluk (MIC) değerleri 0.5-64 mikrogr/ml arasında, MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri ise 1 ve 32 mikrogr/ml olarak bulundu. Flukonazol bazı suşlara 128 mikrogr/ml yoğunlukta bile etkili değildi. Yeni bir antifungal olan ve klinik uygulamalarda başarılı bulunan flukonazol *in-vitro* duyarlılık testlerinde aynı derecede etkili görülmemekte ve hatta bazı *Candida albicans* suşlarına karşı yüksek konsantrasyonlarda etkisiz olabilmektedir.

Anahtar kelimeler : Flukonazol, *Candida albicans*, MIC değerleri, Mikrodilüsyon teknik

Geliş tarihi : 24.7.1992

Kabul tarihi : 9.9.1993

Investigation of In-vitro Activity of Fluconazole Against *Candida Albicans* Strains by the Microdilution Technique

Summary: Different results have been obtained between *in-vitro* and *in-vivo* sensitivities of the new antifungal triazole derivative fluconazole, in several studies. Although the *in-vivo* activity of fluconazole in candidiasis has been found to be sufficient, some *in-vitro* studies have shown that even high concentrations of fluconazole are not inhibitory to *Candida albicans*.

In our study, we investigated the effect of fluconazole by the microdilution technique on strains of *Candida albicans* using Sabouraud Dextrose broth with gentamycin. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were found to be 0.5-64 mikrogr/ml, MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 1 and 32 mikrogr/ml respectively. Some strains were resistant to fluconazole even at a high concentrations of 128 mikrogr/ml.

Although the new antifungal fluconazole has been found very succesful in clinical applications it is not equally succesful in *in-vitro* sensitivity tests and even uneffective against some *Candida albicans* strains at high concentrations.

Key words : Fluconazole, *Candida albicans*, MIC values, Microdilution technique.

Giriş

İmidazol ailesinin, en yeni üyesi olan flukonazol (Fluconazole, UK-49,858) bir triazoldür. Geniş etki spektrumu ile sistemik ve yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Flukonazol'ün antifungal aktivitesi ketokonazol ile aynı olup, mantar hücrelerinde ergosterol sentezi-

ni önler. Spesifik etkisi sterol C-14 dimetilaz enzimi üzerinedir. Bu enzimi inhibe ederek hücre zarı yapısını ve içeriğini değiştirip, hücre duvar sentezi yapan enzimlerin aktivitelerini denetim dışı bırakır. Bu etki diğer imidazol türevlerine göre daha seçicidir¹⁻³.

Candida türleri ve kriptokok gibi mayalara oldukça etkili bulunan flukonazol, dermatofitlere daha az etkilidir³.

(*) Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06330 Beşevler-ANKARA

Flukonazol'ün in-vivo ve in-vitro kullanımları arasında ilişki henüz tam aydınlatılamamıştır⁴. İn-vitro çalışmalar göstermiştir ki, kültür ortamının içeriği, pH, inokulum miktarı, inkübasyon ısısı ve süresi gibi pek çok faktör flukonazolün MIC değerlerinde büyük farklılıklar meydana getirmektedir^{5,6}. Örneğin, *Candida albicans* (*C. albicans*)'a karşı yapılan in-vitro çalışmalarda, diyagnostik test agar kullanıldığında flukonazol 100 mikrogr/ml yoğunlukta etkisiz bulunurken, en duyarlı yöntem olarak kabul edilen doku kültürü agarda 0.01 mikrogr/ml yoğunlukta etkili bulunmuştur⁷.

Farklı kültür ortamlarında farklı sonuçlar alınması nedeni ile, biz de çalışmamızda mantarların üretilmesinde rutin olarak kullanılan Sabouraud besiyerinde flukonazol'ün etkisini araştırmayı amaçladık. Ancak bazı araştırmacılara göre, kompleks besiyerleri antagonistik etki yapabilmektedir³. Bu nedenle özellikle *C. albicans* için, protein sentezine etkili antibiyotiklerin kullanılan besiyerine ilavesi önerilmektedir. Biz de, kompleks besiyerlerinden olan Sabouraud besiyerine gentamisin ilave ederek çalışmamızı gerçekleştirdik.

Gereç ve Yöntem

Hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli örneklerden, etken olarak izole edilen 25 adet *C. albicans* suşu flukonazol'ün in-vitro etkinliğinin araştırılmasında kullanılmıştır. Suşların izolasyonunda, antibiyotik ve antifungal ajan içermeyen Sabouraud dekstroaz agar (SDA) kullanılmış, rutin tiplendirme testleri⁸ ile tiplendirilen mayalar 0-3 °C de saklanmıştır.

Standart inokulum hazırlamak için 24 saatlik maya kültürlerinden homojen süspansiyonlar hazırlanmış ve mikroskopik sayım yöntemleriyle, gerekli sulandırım yapılarak ml'de 5.10^5 cfu olacak şekilde standardize edilmiştir⁶.

Flukonazol'ün etken maddesi Pfizer-Central Research, Sandwich Kent, U. K. dan elde edilmiş ve stok solüsyonu deiyonize suda üretici firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır.

MIC değerlerinin saptanmasında mikrodilüsyon yöntemi ve gentamisinli (200 mikrogr/ml) Sabouraud dekstroaz buyyonu (SDB) kullanılmıştır^{3,9}. Deney sonucunda mikropleytler 30 °C de inkübe edilmiştir⁶.

Bulgular

200 mikrogr/ml gentamisin içeren SDB da, nötral pH da, mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazolün in-vitro etkinliğini araştırdığımız çalışma sonucunda, 25 *C. albicans* suşunun % 76'sının 0.5-2 mikrogr/ml konsantrasyonlarda inhibe olduğu saptanmıştır. 2 suş 128 mikrogr/ml konsantrasyonunda da inhibe olmadığı için dirençli olarak (% 8) kabul edilmiştir. MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri ise 1 ve 32 mikrogr/ml olarak saptanmıştır. Tablo 1'de 25 *C. albicans* suşlarına karşı flukonazol ile elde edilen MIC değerleri verilmektedir.

Tartışma

Flukonazol ile yapılan in-vitro çalışmalarda değişik sonuçların elde edilmesi in-vitro ve in-vivo duyarlılık arasında bağlantı kurulmasını zorlaştırmaktadır. İn-vitro çalışmaların sonuçlarını değişik kültür ortamlarının kullanılması, ortamın pH'sı, inokulum miktarı, inkübasyon ısısı gibi faktörler etkilemektedir^{5,6}. Örneğin, doku kültürü agarı, High Resolution Media (HR besiyeri), SAAM-Fungal Susceptibility Medium (SAAMF buyyonu) gibi özel besiyerlerinde flukonazol düşük MIC değerleri vermekte ve optimal aktivite göstermektedir^{3,6}. Sabouraud-dekstroaz buyyonu, DST agar, BHI besiyeri gibi kompleks besiyerleri antagonistik etki yapabilmektedir. Ancak, bu be-

Tablo 1. 25 *C. albicans* Suşlarına Karşı Flukonazol ile Elde Edilen MIC Değerleri

MIC (microgr/ml)	0.125	0.250	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Suşların sayısı	-	-	2	10	7	-	1	1	1	1	-	2*

* Dirençli Suşlar

siyerlerine sitoplazmik ribozomlar düzeyinde protein sentezini önleyen antibiyotiklerin ilave edilmesi ile bu etkinin ortadan kalkabildiğini ileri süren yayınlar vardır³.

Çalışmamızda, mantarların üretilmesinde rutin olarak kullanılan kompleks besiyerlerinden Sabouraud buyyonunu, gentamisin ilave ederek kullandık. İncelediğimiz 25 *C. albicans* suşunun 2 sini çalıştığımız ilaç konsantrasyonlarında dirençli bulmakla birlikte, diğе suşlar için, Sabouraud buyyonu kullanan Sekhon ve ark.⁶ MIC 100 mikrgr/ml sonuçlarından çok daha düşük MIC değerleri elde ettik (Tablo 1).

MIC değerlerimiz 0.5 ile >128 mikrgr/ml arasında değişirken, MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerlerimiz ise 1 ve 32 mikrgr/ml olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlar Sekhon ve ark. HR besiyerindeki MIC 1.56 mikrgr/ml⁶, Perfect ve ark.¹⁰, Rogers ve Galgiani'nin¹¹ SAAMF buyyonundaki MIC 0.125-0.5 mikrgr/ml arasındaki değerlerinden biraz yüksektir.

Marriot ve Richardson doku kültürü agarda flukonazol'un, in-vitro etkinliğinin düşük pH'ya oranla 7-7.5 pH'da daha fazla olduğunu göstermişler ve MIC değerlerini *C. albicans* için 0.39 mikrgr/ml olarak bulmuşlardır³. Biz de, deneyimizi nötral pH'da uyguladık. Ancak, MIC değerlerimiz doku kültürü agarındaki sonuçlara göre yüksek bulunmuştur.

İn-vivo uygulamalarda, özellikle mayalarda, çok etkili bulunan flukonazol^{1,3} in-vitro çalışmalarda güvenilir sonuçlar vermemektedir. Azol türevlerinde in-vitro duyarlılık ile in-vivo etki arasındaki korelasyonun gerekli olmadığı görüşü¹² flukonazol için de geçerli olmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda, bu konuda ileri sürülen görüşlere katılmakta ve rutin olarak kullanılan Sabouraud besiyerine 200 mikrgr/ml gentamisin ilavesinin, antibiyotiksiz Sabouraud besiyeri kullanılarak yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına bakarak, in-vitro duyarlılık deneyleri için uygun olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Tümbay, E., "Sistemik Etkili Yeni Bir Antifungal Kemoterapötik: Flukonazol", *İnfeksiyon Dergisi*, 3, 3-4, 1989.
2. Washton, H., "Review of Flukonazole: A new Triazole Antifungal Agent", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 12, 229S-233S, 1989.
3. Marriot, M. S., Richardson, K., "The Discovery and Mode of Action of Fluconazole", in Fromtling, R.A. (ed), *Recent Trends In the Discovery and Evaluation of Antifungal Agents*, Barcelona, J. R. Prous Science Publishers, p. 81-102, 1987.
4. Grant, S. M., Clissold, S. P., "Flukonazole: A Review of its Pharmacodynamics and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential in Superficial and Systemic Mycosis", *Drugs*, 39, 877-916, 1990.
5. Doern, G. V., Tubert, T. A., Chapin, K., "Effect of Culture Medium on In-vitro Susceptibility Testing of Flukonazole Against Some Yeasts" *Mycoses*, 34, 319-322, 1991.
7. Richardson, K., Andrews, R. J., Marriot, M. S., Tarbit, M. H., Troke, P. F., "Correlation of In-Vitro and In-Vivo Activity of Azole Antifungals", in Iawata, K., Van Den Bossche, H. (eds), *In-Vitro and In-Vivo Evaluation of Antifungal Agents*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, p. 147-149, 1986.
8. Cheesbrough, M., "Mycology", *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries Volum II: Microbiology*, Cambridge, Butterworth and Co Publishers, p. 389-390, 1984.
9. Ghannoum, M. A., Sharif, H. F., Al-Gharreer, H., "Sensivity of Clinical Yeast Isolates in Kuwait against a Number of Antifungal Agents" *Mykosen*, 27, 402-410, 1984.
10. Perfect, J. R., Savani, D. V., Durack, D. T., "Comparison of Itriconazole and Fluconazole in Treatment of Cryptococcal Meningitis and Candida Pyelonephritis in Rabbits", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 579-583, 1988.
11. Rogers, T. E., Galgiani, J. N., "Activity of Fluconazole UK 49, 858 and Ketoconazole Against *C. albicans* In-Vitro and In-Vivo", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 418-422, 1986.
12. Graybill, J. R., "Flukonazole Efficacy in Animal Models of Mycotic Diseases", in Fromtling, R. A. (ed), *Recent Trends in The Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*, Barcelona, J. R. Prous Science Publishers, p. 113-124, 1987.